

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets⁶: C12N 15/10, C07H 21/00, C12Q 1/68</p>		A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/35002 (43) Date de publication internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00472 (22) Date de dépôt international: 17 mars 1997 (17.03.97)</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>	
<p>(30) Données relatives à la priorité: 96/03519 21 mars 1996 (21.03.96) FR</p>		<p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p>			
<p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): WILS, Pierre [FR/FR]; 36, rue de Montmorency, F-75003 Paris (FR). OLLIVIER, Monique [FR/FR]; 9, place Victor-Hugo, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre (FR).</p>			
<p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p>			

(54) Title: PURIFICATION OF PHARMACEUTICAL-GRADE PLASMID DNA

(54) Titre: PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE DE QUALITE PHARMACEUTIQUE

(57) Abstract

A method for purifying pharmaceutical-grade plasmid DNA by means of at least one hydroxyapatite column chromatography step is disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé pour la purification d'ADN plasmidiique de qualité pharmaceutique comprenant au moins une étape de chromatographie colonne hydroxyapatite.

DELIVERY VIA: 1st CLASS U.S. MAIL



For questions regarding this delivery, please contact Product Support at 800-334-2564 or fax us at 415-254-8123. Please have your DIALOG User Number and order number available.

Document ID: US 5681562

For:

GENEMEDICINE, INC
ATTN: MICHAEL P. FONS
8301 NEW TRAILS DRIVE
THE WOODLANDS
TX 77381-4248
USA

Subaccount:	KR SOURCEONE
Subject:	\$5.00
Estimated Cost ^r :	97/11/04
Date:	1971104-86743
Number:	139018
User Number:	57
Number of Pages:	

* Charges listed are for informational purposes only. Does not include applicable tax, copyright or outside purchase fees, or telecommunications charges.

Copyrighted material reproduced with permission of copyright owner and further reproduction is prohibited or otherwise subject to restrictions.
Patents are not copyrighted and may be freely reproduced.

KNIGHT-RIDDER INFORMATION Knight-Ridder Information, Inc., Worldwide Headquarters
2440 El Camino Real, Mountain View, CA 94040
800-334-2564 or 415-254-8700

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizstan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	R	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE DE QUALITE PHARMACEUTIQUE

La présente invention concerne un nouveau procédé pour la purification d'ADN. Le procédé selon l'invention permet de purifier rapidement de l'ADN double brin utilisable pharmacologiquement. Plus particulièrement, le procédé de purification 5 selon l'invention ne fait intervenir que de la diafiltration et des chromatographies.

Les techniques de thérapie génique et cellulaire connaissent actuellement un développement extraordinaire. Néanmoins, ces techniques impliquent la possibilité de produire des quantités importantes d'ADN de pureté pharmacologique, en particulier d'ADN plasmidique. En effet dans ces nouvelles thérapies, le médicament est souvent 10 constitué par l'ADN lui-même, et il est essentiel de pouvoir le fabriquer dans des quantités adaptées, l'isoler et le purifier de manière appropriée à un usage thérapeutique chez l'homme, notamment par voie intraveineuse.

Ces problèmes de quantités et de pureté n'ont pas été pris en compte dans les méthodes classiques d'isolement de l'ADN. De ce fait les méthodes utilisées en 15 laboratoire ne sont pas transposables dans le domaine de l'industrie pharmaceutique pour purifier de l'ADN plasmidique. Deux de ces méthodes sont les plus utilisées et sont celles qui donnent les meilleurs résultats. Elles consistent à partir d'un lysat bactérien brut et à l'enrichir en ADN plasmidique en éliminant un maximum de contaminants. En particulier le lysozyme du blanc d'oeuf est utilisé pour casser la paroi 20 bactérienne puis le lysat est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite soumis à l'action d'une RNase pancréatique d'origine animale qui permet d'éliminer l'ARN, qui représente à ce moment environ 75% des acides nucléiques présents.

Les protéines sont alors précipitées par un mélange phénol/ 25 chloroforme/isoamyl-alcool. Le surnageant obtenu après centrifugation est débarrassé des protéines et de l'ARN mais contient encore de grandes quantités d'ADN chromosomique qui doit être éliminé lors d'une étape supplémentaire. Cette étape consiste en une ultracentrifugation en présence de Bromure d'Ethidium et de Chlorure de Césium. Les trois types d'acides nucléiques que sont l'ADN chromosomique, l'ADN

plasmidique et l'ARN ont une plus ou moins grande capacité à fixer le bromure d'éthidium. De ce fait ils se séparent en trois phases distinctes lors d'une ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césum.

Une variante de ce protocole consiste à faire suivre l'action de la Rnase pancréatique par une réduction en présence d'un détergent alcalin, suivie par une extraction au phénol/ chloroforme. L'ADN est alors précipité par de l'éthanol, remis en suspension et reprécipité au polyéthylène glycol.

Ces deux méthodes qui permettent d'obtenir une solution d'ADN plasmidique sont cependant inutilisables pour la production industrielle d'un produit de pureté pharmaceutique. En effet l'utilisation d'enzymes d'origine animale pose problème. Ainsi le lysozyme et la Rnase pancréatique, du fait de leur origine, risquent d'introduire une contamination virale dans le produit final. De plus, les solvants organiques sont extrêmement toxiques et doivent être éliminés si l'on veut pouvoir utiliser le produit comme médicament. Ces solvant induisent également une augmentation considérable des coûts, liée notamment à leur stockage, leur utilisation dans des conditions de sécurité maximales et l'élimination des déchets toxiques qu'ils imposent, et aussi en raison de la difficulté rencontrée pour réussir à valider l'élimination complète de tels produits de la solution finale. Le bromure d'éthidium est quand à lui tellement毒ique, mutagène et tératogène que sa présence même sous forme de traces ne peut être tolérée dans un produit à destination pharmaceutique. L'utilisation de solvants, de réactifs toxiques, de même que d'enzymes d'origine animale est incompatible avec un procédé industriel répondant aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

La présente invention décrit un nouveau procédé simple et particulièrement efficace pour la purification d'ADN. Le procédé décrit dans la présente demande permet la production en grande quantité d'un ADN de très grande pureté. D'une manière particulièrement avantageuse le procédé décrit dans la présente demande permet d'éviter l'emploi de solvants organiques toxiques et d'enzymes d'origine animale. Il permet également de s'affranchir de centrifugations nombreuses et fastidieuses difficiles à extrapoler et de faible rendement en raison notamment d'étapes de précipitation au PEG, à l'acétate d'ammonium ou au CaCl₂. Le procédé selon

l'invention permet également d'obtenir de grandes quantités d'ADN (100 mg, 1g, 10 g ou plus) en un seul lot, sans difficulté technique particulière. En outre le procédé selon l'invention fait appel à des méthodes compatibles avec les Bonnes Pratiques de Fabrication et permet d'obtenir un ADN de qualité pharmaceutique.

5 Un premier objet de l'invention concerne un procédé pour la purification d'ADN double-brin permettant d'obtenir très rapidement de grandes quantités d'ADN plasmidique de pureté pharmaceutique, faisant intervenir une étape de chromatographie sur colonne hydroxyapatite sous forme céramique. L'hydroxyapatite sous forme cristalline était déjà connue mais, du fait de sa fragilité, d'un emploi difficile et limité. La forme céramique est beaucoup plus résistante autant sur un plan physique
10 que sur un plan chimique.

D'une manière préférée, le procédé de l'invention comprend deux étapes de chromatographie, l'une au moins étant une chromatographie sur hydroxyapatite.

15 Avantageusement, la deuxième chromatographie est une chromatographie d'affinité ou d'échange d'ions. Les deux chromatographies peuvent être faites dans un ordre indifférent.

20 Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, le procédé selon l'invention comprend une étape de chromatographie sur colonne hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité Triple-Hélice. La chromatographie d'affinité Triple-Hélice est basée sur l'utilisation d'un support sur lequel est couplé de manière covalente un oligonucléotide capable de former par hybridation une triple hélice avec une séquence spécifique présente sur ledit ADN. Les deux chromatographies peuvent être faites dans un ordre indifférent.

25 Selon un autre mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'échange d'anions.

Avantageusement, le procédé de l'invention comprend en outre une étape de diafiltration. Celle-ci est généralement réalisée avant les chromatographies.

Une étape importante du procédé de l'invention fait intervenir une chromatographie sur colonne hydroxyapatite.

L'hydroxyapatite est un phosphate de calcium complexe comportant dix atomes de calcium. La forme céramic plus stable que la forme cristalline a été mise 5 au point par Bio-Rad Laboratories et Asahi Optical Co., Ltd. Le composé céramique a les mêmes propriétés que le composé cristallin sans en avoir les limitations physiques; ce matériau est surtout utilisé en chromatographie pour la purification des protéines, mais présente des avantages et permet d'obtenir de très bons résultats lors de la purification d'acides nucléiques. Il est macroporeux, sphérique, chimiquement et 10 physiquement très stable et peut être réutilisé plusieurs dizaines de fois sans pertes d'efficacité. Cette forme ceramic peut supporter des pressions élevées, des pH très élevés, des flux très rapides et les solvants organiques.

La chromatographie sur colonne de ceramic hydroxyapatite est un type de chromatographie particulier qui n'est ni une chromatographie d'affinité ni un échange 15 d'ion aux sens stricts. Elle empreinte ses propriétés à ces deux types de chromatographies et l'on pourrait la définir comme a une pseudo-affinité et un pseudo échange d'ions.

Les acides nucléiques se lient à l'hydroxyapatite par la vertu d'interactions entre les groupes phosphate du squelette du polynucléotide et les résidus calcium du 20 support. Les acides nucléiques peuvent être élusés de façon différentielle en faisant varier la force ionique des tampons phosphates. Les acides nucléiques peuvent être ainsi séparés des protéines et entre eux, les ADN des ARN et les ADN simple brins des ADN double-brins. Les ARN sont ceux qui se lient de la manière la moins solide et peuvent être élusés avec un tampon de force ionique relativement faible. Les ADN 25 simple brins sont également moins fortement fixé que les ADN double-brins qui sont plus solidement liés au support et nécessitent un tampon plus fort.

Le matériel biologique dans un tampon phosphate de faible force ionique est déposé sur la colonne. Les acides nucléiques ADN et ARN sont fixés. Un second tampon, de force ionique plus élevée, est ensuite utilisé pour éluer l'ARN qui est

quasiment complètement éliminé à ce stade. Un troisième tampon de force ionique supérieure est utilisé pour éluer l'ADN double brin qui est recueilli. L'utilisation d'hydroxyapatite dans le procédé de l'invention permet de récupérer de l'ADN double brin ayant un très grand degré de pureté.

5 Comme indiqué ci-avant, un mode de réalisation préféré de l'invention comprend en outre une étape de chromatographie d'affinité triple hélice.

La chromatographie d'affinité triple hélice consiste à faire passer la solution obtenue sur un support sur lequel est couplé de manière covalente un oligonucléotide capable de former par hybridation une triple hélice avec une séquence spécifique 10 présente sur l'ADN à purifier (WO96/18744).

La séquence spécifique peut être une séquence présente naturellement sur l'ADN double-brin, ou une séquence synthétique introduite artificiellement dans celui-ci. Les oligonucléotides utilisés dans la présente invention sont des oligonucléotides hybridant directement avec l'ADN en double-brin. Ces 15 oligonucléotides peuvent contenir les bases suivantes :

- thymidine (T), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin (Rajagopal et al, Biochem 28 (1989) 7859);

- adénine (A), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin;

20 - guanine (G), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin;

- cytosine protonée (C+), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin (Rajagopal et al précitée);

25 - uracile (U) qui est capable de former des triplets avec les paires de bases A.U ou A.T.

Préférentiellement, l'oligonucléotide utilisé comprend une séquence homopyrimidique riche en cytosines et la séquence spécifique présente sur l'ADN est une séquence homopurique-homopyrimidique. La présence de cytosines permet d'avoir une triple hélice stable à pH acide, où les cytosines sont protonées, et 5 déstabilisée à pH alcalin, où les cytosines sont neutralisées.

Pour permettre la formation d'une triple-hélice par hybridation, il est important que l'oligonucléotide et la séquence spécifique présente sur l'ADN soient complémentaires. A cet égard, pour obtenir les meilleurs rendements et la meilleure sélectivité, on utilise dans le procédé de l'invention un oligonucléotide et une 10 séquence spécifique parfaitement complémentaires. Il peut s'agir en particulier d'un oligonucléotide poly-CTT et d'une séquence spécifique poly-GAA. A titre d'exemple, on peut citer l'oligonucléotide de séquence 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (GAGG(CTT)7; (SEQ ID n°1), dans lequel les bases GAGG ne forment pas de triple hélice mais permettent d'espacer 15 l'oligonucléotide du bras de couplage. On peut également citer la séquence (CTT)7 (SEQ ID n°2). Ces oligonucleotides sont capables de former une triple-hélice avec une séquence spécifique comportant des motifs complémentaires (GAA). Il peut s'agir en particulier d'une région comportant 7, 14 ou 17 motifs GAA, comme décrit dans les exemples.

20 Une autre séquence d'intérêt spécifique est la séquence :

5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3'(SEQ ID n°3).

Cette séquence forme une triple hélice avec les oligonucléotides

5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3'(SEQ ID n°4) ou

5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGTT-3'(SEQ ID n°5).

25 Dans ce cas, l'oligonucléotide se fixe dans une orientation antiparallèle au brin polypurique. Ces triples hélices ne sont stables qu'en présence de Mg²⁺ (Vasquez et

al., Biochemistry, 1995, 34, 7243-7251 ; Beal et Dervan, Science, 1991, 251, 1360-1363).

Comme indiqué ci-dessus, la séquence spécifique peut être une séquence présente naturellement sur l'ADN double-brin, ou une séquence synthétique introduite artificiellement dans celui-ci. Il est particulièrement intéressant d'utiliser un oligonucléotide capable de former une triple-hélice avec une séquence présente naturellement sur l'ADN double-brin, par exemple dans l'origine de réPLICATION d'un plasmide ou dans un gène marqueur. A cet égard, la demanderesse a effectué des analyses de séquence de plasmides et a pu montrer que certaines régions de ces ADN, notamment dans l'origine de réPLICATION, possèdent des régions homopurique-homopyrimidiques. La synthèse d'oligonucléotides capables de former des triple-hélices avec ces régions homopurique-homopyrimidiques naturelles permet avantageusement d'appliquer le procédé de l'invention à des plasmides non modifiés, notamment des plasmides commerciaux de type pUC, pBR322, pSV, etc. Parmi les séquences homopuriques-homopyrimidiques naturellement présentes sur un ADN double brin, on peut citer une séquence comprenant tout ou partie de la séquence 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3'(SEQ ID n°6) présente dans l'origine de réPLICATION ColE1 de *E. coli*. Dans ce cas, l'oligonucléotide formant la triple hélice possède la séquence : 5'-GAAGGGTTCTTCCCTTTCC-3'(SEQ ID n°7) et se fixe alternativement sur les deux brins de la double hélice, comme décrit par Beal et Dervan (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4976-4982) et Jayasena et Johnston (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 5279-5288). On peut aussi citer la séquence 5'-GAAAAAGGAAGAG-3'(SEQ ID n°8) du gène de la β-lactamase du plasmide pBR322 (Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 504-508). L'utilisation d'un oligonucléotide capable de former une triple-hélice avec une séquence présente dans une origine de réPLICATION ou un gène marqueur est particulièrement avantageuse car elle permet, avec le même oligonucléotide, de purifier tout ADN contenant ladite origine de réPLICATION ou ledit gène marqueur. Il n'est donc pas nécessaire de modifier le plasmide ou l'ADN double-brin pour lui incorporer une séquence spécifique artificielle.

Bien que des séquences parfaitement complémentaires soient préférées il est entendu toutefois que certains mésappariements peuvent être tolérés entre la séquence de l'oligonucléotide et la séquence présente sur l'ADN, dès lors qu'ils ne conduisent pas à une perte trop grande d'affinité. On peut citer la séquence 5'-
5 AAAAAGGGAAATAAGGG-3'(SEQ ID n°9) présente dans le gène de la β -lactamase de *E. coli*. Dans ce cas, la thymine interrompant la séquence polypurique peut être reconnue par une guanine du troisième brin, formant ainsi un triplet ATG qui est stable quand il est encadré par deux triplets TAT (Kiessling et al., Biochemistry, 1992, 31, 2829-2834).

10 Selon un mode de réalisation particulier, les oligonucléotides de l'invention comprennent la séquence (CCT)_n, la séquence (CT)_n ou la séquence (CTT)_n, dans laquelle n est un nombre entier compris entre 1 et 15 inclus. Il est particulièrement avantageux d'utiliser des séquences de type (CT)_n ou (CTT)_n. La demanderesse a en effet montré que le rendement de purification était influencé par la quantité de C dans
15 l'oligonucléotide. En particulier, comme indiqué dans l'exemple 7, le rendement de purification augmente lorsque l'oligonucleotide comporte moins de cytosines. Il est entendu que les oligonucléotides de l'invention peuvent également combiner des motifs (CCT), (CT) ou (CTT).

20 L'oligonucléotide utilisé peut être naturel (composé de bases naturelles, non modifiées) ou modifié chimiquement. En particulier, l'oligonucléotide peut présenter avantageusement certaines modifications chimiques permettant d'augmenter sa résistance ou sa protection vis à vis des nucléases, ou son affinité vis à vis de la séquence spécifique.

Selon la présente invention on entend aussi par oligonucléotide tout
25 enchainement de nucléosides ayant subi une modification du squelette dans le but de le rendre plus résistant aux nucléases. Parmi les modifications possibles on peut citer, les oligonucléotides phosphorothioates qui sont capable de former des triples hélices avec l'ADN (Xodo et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22, 3322-3330), de même que les oligonucléotides possédant des squelettes formacétal ou méthylphosphonate

(Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 7767-7768). On peut également utiliser les oligonucléotides synthétisés avec des α -anomères de nucléotides, qui forment également des triples hélices avec l'ADN (Le Doan et al., Nucleic Acids Res., 1987, 15, 7749-7760). Une autre modification du squelette est la liaison phosphoramidate. On peut citer par exemple la liaison internucléotidique N3'-P5' phosphoramidate décrite par Gryaznov et Chen, qui donne des oligonucléotides formant avec l'ADN des triples hélices particulièrement stables (J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 3143-3144). Parmi les autres modifications du squelette, on peut citer également l'utilisation de ribonucléotides, de 2'-O-méthylribose, de phosphodiester,...(Sun et Hélène, Curr. Opinion Struct. Biol., 16, 3143-3144). Le squelette phosphoré peut enfin être remplacé par un squelette polyamide comme dans les PNA (Peptide Nucleic Acid), qui peuvent également former des triples hélices (Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500 ; Kim et al., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 6477-6481) ou par un squelette à base de guanidine, comme dans les DNG (déoxyribonucleic guanidine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 6097-6101), analogues polycationiques de l'ADN, qui forment également des triples hélices.

La thymine du troisième brin peut aussi être remplacée par une 5-bromouracile, ce qui augmente l'affinité de l'oligonucléotide pour l'ADN (Povsic et Dervan, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 3059-3061). Le troisième brin peut également contenir des bases non naturelles, parmi lesquelles on peut citer la 7-déaza-2'-déoxyxanthosine (Milligan et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 327-333), la 1-(2-déoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-méthyl-5-amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine-7-one (Koh et Dervan, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1470-1478), la 8-oxoadénine, la 2-aminopurine, la 2'-O-méthyl-pseudoisocytidine, ou toute autre modification connue de l'homme du métier (voir pour revue Sun et Hélène, Curr. Opinion Struct. Biol., 1993, 3, 345-356).

Un autre type de modification de l'oligonucléotide a plus particulièrement pour objet d'améliorer l'interaction et/ou l'affinité entre l'oligonucléotide et la séquence spécifique. En particulier, une modification tout à fait avantageuse selon l'invention consiste à méthylérer les cytosines de l'oligonucléotide. L'oligonucléotide

ainsi méthylé présente la propriété remarquable de former une triple hélice stable avec la séquence spécifique dans des zones de pH plus proches de la neutralité(≥ 5). Il permet donc de travailler à des pH plus élevés que les oligonucléotides de l'art antérieur, c'est à dire à des pH où les risques de dégradation de l'ADN plasmidique sont bien inférieurs.

La longueur de l'oligonucléotide utilisé dans le procédé de l'invention est d'au moins 3 bases, et de préférence, comprise entre 5 et 30. On utilise de manière avantageuse un oligonucléotide de longueur supérieure à 10 bases. La longueur peut être adaptée au cas par cas par l'homme du métier en fonction de la sélectivité et de la 10 stabilité de l'interaction recherchées.

Les oligonucléotides selon l'invention peuvent être synthétisés par toute technique connue. En particulier, ils peuvent être préparés au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut bien évidemment être utilisée.

Pour permettre son couplage covalent sur le support, l'oligonucléotide est généralement fonctionnalisé. Ainsi, il peut être modifié par un groupement terminal thiol, amine ou carboxyle, en position 5' ou 3'. En particulier, l'ajout d'un groupe thiol, amine ou carboxyle permet, par exemple, de coupler l'oligonucléotide sur un support portant des fonctions disulfure, maléimide, amine, carboxyle, ester, époxyde, 20 bromure de cyanogène ou aldéhyde. Ces couplages se forment par établissement de liaisons disulfure, thioether, ester, amide ou amine entre l'oligonucléotide et le support. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut être utilisée, telle que des réactifs de couplage bifonctionnels, par exemple.

Par ailleurs, pour améliorer l'hybridation avec l'oligonucléotide couplé, il peut être avantageux que l'oligonucléotide contienne un "bras" et une séquence de bases "espaceur". L'utilisation d'un bras permet en effet de fixer l'oligonucléotide à une distance choisie du support permettant d'améliorer ses conditions d'interaction avec l'ADN. Le bras est avantageusement constitué d'une chaîne carbonée linéaire, comprenant 1 à 18, et de préférence 6 ou 12 groupes (CH₂), et d'une amine qui

permet la liaison à la colonne. Le bras est relié à un phosphate de l'oligonucléotide ou d'un "espaceur" composé de bases n'interférant pas avec l'hybridation. Ainsi, "l'espaceur" peut comprendre des bases puriques. A titre d'exemple, "l'espaceur" peut comprendre la séquence GAGG. Le bras est avantageusement composé d'une chaîne 5 carbonée linéaire comprenant 6 ou 12 atomes de carbones.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, différents types de supports peuvent être utilisés. Il peut s'agir de supports de chromatographie fonctionnalisés, en vrac ou préconditionnés en colonne, de surfaces plastiques fonctionnalisées ou de billes de latex fonctionnalisées, magnétiques ou non. Il s'agit préférentiellement de 10 supports de chromatographie. A titre d'exemple, les supports de chromatographie pouvant être utilisés sont l'agarose, l'acrylamide ou le Dextran ainsi que leurs dérivés (tels que Séphadex, Sépharose, Superose...), les polymères tels que le poly(styrènedivinylbenzène), ou la silice greffée ou non greffée, par exemple. Les colonnes de chromatographie peuvent fonctionner en mode de diffusion ou de 15 perfusion.

Pour obtenir de meilleurs rendement de purification, il est particulièrement avantageux d'utiliser, sur le plasmide, une séquence comportant plusieurs positions d'hybridation avec l'oligonucléotide. La présence de plusieurs positions d'hybridation favorise en effet les interactions entre ladite séquence et l'oligonucléotide, ce qui 20 conduit à améliorer les rendements de purification. Ainsi pour un oligonucléotide comportant n répétitions de motifs (CCT), (CT) ou (CTT), il est préférable d'utiliser une séquence d'ADN comportant au moins n motifs complémentaires et, de préférence, $n+1$ motifs complémentaires. Une séquence portant $n+1$ motifs complémentaires offre ainsi deux positions d'hybridation à l'oligonucléotide. 25 Avantageusement, la séquence d'ADN comporte jusqu'à 11 positions d'hybridation, c'est à dire $n+10$ motifs complémentaires.

Selon un autre mode de réalisation la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique est suivie ou précédée d'une étape de chromatographie sur colonne d'échange d'anions. On utilise de préférence une colonne échangeuse

d'anions faibles., les anions forts ont en effet la propriété de fixer très fortement l'ADN, si fortement qu'il est très difficile de récupérer le produit (le rendement est alors inférieur à 60%). C'est pourquoi la demanderesse utilise des échangeurs d'anions faibles qui ne retiennent pas l'ADN plasmidique mais qui fixent les ARN résiduels.

5 Comme indiqué ci-avant, le procédé selon l'invention comprend avantageusement une étape de diafiltration. La diafiltration est une étape de concentration de l'échantillon au cours de laquelle on élimine l'eau et les petites molécules (telles que les sels, les protéines et les acides nucléiques de petite taille) présentes dans le lysat clair. Les sels sont remplacés par un tampon phosphate pour la
10 chromatographie. Après diafiltration, la solution est de 5 a 50 fois plus concentrée que la solution de départ (le facteur de concentration dépend du volume de la solution de départ).

L'utilisation de la diafiltration présente plusieurs avantages. Elle permet entre autres d'éviter l'utilisation de solvants organiques tel que l'isopropanol dont l'emploi
15 nécessiterait une installation anti-déflagrante. De plus, cette technique est utilisable pour des volumes très variables. Il suffit en effet d'augmenter la surface des membranes en fonction du volume à traiter.

On utilise avantageusement pour la diafiltration un appareil servant de support à une membrane de polyether sulfone modifié ou d'acétate de cellulose modifié
20 permettant d'avoir un flux de liquide à débit régulable. Ces membranes sont définies par leur point de coupure qui est en valeur nominale la taille maximale des molécules pouvant traverser ladite membrane. Rapporté à une valeur réelle une membrane dont le point de coupure est égal à 100 kD permet de retenir des molécules de taille supérieure à 30 kD.

25 Un procédé préféré selon l'invention comprend les étapes suivantes :
 diafiltration,
 chromatographie sur colonne de Ceramic hydroxyapatite,
 et chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une séquence de l'ADN et un oligonucléotide avec formation d'une triple hélice.

Le procédé selon la présente invention peut être utilisé pour purifier tout type d'ADN double brin. Il s'agit par exemple d'ADN circulaire, tel qu'un plasmide portant généralement un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. Ce plasmide peut porter également une origine de réPLICATION, un gène marqueur, etc.... Ce procédé permet 5 aussi de purifier de l'ADN, linéaire ou circulaire, portant une séquence d'intérêt, à partir d'un mélange comprenant des ADN de différentes séquences.

Généralement, l'ADN de départ est produit par un microorganisme hôte modifié par les techniques de l'ADN recombinant. A cet égard l'hôte contenant l'ADN double brin que l'on cherche à récupérer est tout d'abord multiplié et amplifié. Pour ce 10 faire on utilise les techniques classiques de fermentation permettant d'obtenir une forte densité cellulaire. La technique la plus couramment employée est celle dite de "fed-batch" qui est abondamment décrite dans la littérature (Jung et al. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1988, 139, p129-146 ; Bauer et al. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, 18, p81-94).

La fermentation est suivie par une lyse des cellules. Pour lyser les cellules on 15 peut utiliser soit un système mécanique soit un système chimique suivant le type de cellules concerné ou suivant que l'on souhaite travailler sur lysat brut ou sur lysat clair. Pour la lyse mécanique, on utilise de préférence des systèmes qui ne dénaturent pas l'ADN (agitation, choc thermique, choc osmotique). Ces méthodes ne sont pas adaptées à l'extraction d'ADN à partir des cellules procaryotes. En effet les 20 traitements mécaniques utilisés pour casser des cellules procaryotes sont dénaturant pour l'ADN. La lyse mécanique est préférentiellement réservée aux cellules eucaryotes, pour les cellules procaryotes on préférera une lyse chimique.

Les cellules procaryotes sont lysées chimiquement par toute technique connue de l'homme du métier (déttergents, lysozymes, éventuellement combinés à un choc 25 thermique, etc). Préférentiellement, on utilise un mélange de soude et de SDS. Durant ce traitement le pH passe à 12. Le pH du lysat ainsi obtenu est ensuite ramené à environ 6 ce qui entraîne la précipitation des protéines d'une partie de l'ADN chromosomique et de l'ARN. On élimine ce précipité par centrifugation.

Un mode de réalisation préféré de l'invention consiste tout d'abord à faire subir aux cellules contenant l'ADN double brin à purifier une lyse chimique qui permet d'obtenir un lysat clair. Le lysat clair ainsi obtenu subit une diafiltration et c'est le concentrat ainsi obtenu qui est chromatographié sur colonne hydroxyapatite céramique.

5

Le lysat cellulaire peut être un lysat de cellules procaryotes ou eucaryotes.

S'agissant de cellules procaryotes, on peut citer par exemple les bactéries E. coli, B. subtilis, S. typhimurium ou Streptomyces. S'agissant de cellules eucaryotes, on peut citer les cellules animales, les levures, les champignons, etc..., et plus 10 particulièrement, les levures Kluyveromyces ou Saccharomyces ou les cellules COS, CHO, C127, NIH3T3, etc....

Le procédé de l'invention est particulièrement avantageux puisqu'il permet d'obtenir, de manière rapide et simple, de l'ADN plasmidique de très haute pureté. En particulier, comme illustré dans les exemples, ce procédé permet de séparer efficacement l'ADN plasmidique considéré de composants contaminants, tels que l'ADN chromosomique fragmenté, l'ARN, les endotoxines, les protéines, les nucléases, etc.... Plus particulièrement, le procédé de l'invention permet d'obtenir des préparation d'ADN double brin, notamment plasmidique, pratiquement exemptes d'ADN chromosomique (< 0,5%). En outre les préparations d'ADN obtenues ont 20 également une teneur en endotoxines très faible (< 50 EU/mg), compatible avec une utilisation pharmaceutique.

La demanderesse a montré que, de manière tout à fait étonnante, la combinaison des deux étapes décrites plus haut à savoir chromatographie sur colonne Hydroxyapatite suivie ou précédée par une chromatographie Triple Hélice, permet 25 d'obtenir des préparations d'ADN plasmidique ayant une teneur en ADN chromosomique de 0.01%. De manière tout à fait préférentielle l'invention concerne également des préparation d'ADN plasmidique ayant une teneur en ADN chromosomique inférieure ou égale à 0.01%.

L'invention concerne également des préparations d'ADN plasmidique ayant une teneur en endotoxines inférieure à 50 EU/mg, préférentiellement inférieure à 10 EU/mg. La teneur en endotoxines est donc très en dessous de la teneur autorisée qui est de 350 EU/ injection pour une personne pesant 70 kg (une EU est une Endotoxin Unit et 5 est égale à 100 pg).

La présente invention décrit donc des compositions comprenant de l'ADN plasmidique utilisable pharmaceutiquement notamment en thérapie génique ou cellulaire *in vivo* ou *ex vivo*. A cet égard, l'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant de l'ADN double brin, linéaire ou 10 plasmidique, préparé selon le procédé décrit ci-dessus.

Les compositions peuvent comporter l'ADN plasmidique "nu" ou associé à des vecteurs de transport tels que les liposomes, les nanoparticules, les lipides cationiques, les polymères, des protéines ou virus recombinants, etc.

La présente demande sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui 15 suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

MATERIEL ET METHODES

1. Construction du plasmide pXL2784.

Dans les expériences qui suivent on a utilisé un plasmide spécifique pXL2784. Ce plasmide comporte une cassette contenant le promoteur du Cytomégalovirus, le 20 gène codant pour la luciférase et une séquence homopurique-homopyrimidique (GAA)17. La construction de ce plasmide est décrite ci-après. Il est bien évident que le procédé selon l'invention n'est pas limité au plasmide décrit.

1.1. Description du plasmide pXL2784

Le plasmide pXL2784 est construit à partir du vecteur plasmidique pXL2675 25 (2,513 kb), réplicon minimal du plasmide ColE1 issu du plasmide pBluescript (ORI) et ayant pour marqueur de sélection le gène du transposon Tn5 codant pour la résistance

à la kanamycine. Le plasmide pXL2784 contient aussi une séquence homopurique-homopyrimidique (GAA)₁₇ issue du plasmide pXL2563 et pouvant se lier à un oligomère (CTT)_n où n=1 à 17, pour générer localement une structure triple hélice et permettre une purification par affinité. Le plasmide pXL2784 possède le locus cer 5 (382 bp) issu du plasmide ColE1 et cloné dans le plasmide pXL565 ; le locus cer contient une séquence site spécifique des recombinases XerC/XerD et conduit à la résolution de multimères de plasmides. Le transgène cloné sur ce plasmide pXL2784 est une cassette d'expression (3,3 kb) du gène luc codant pour la luciférase de Photinus pyralis sous contrôle du promoteur P CMV cytomégavirus humain, cette 10 cassette provient du plasmide pXL2622.

Le plasmide a une taille de 6390 bp. La carte du plasmide pXL2784 est présentée sur la figure 1, et sa construction est détaillée ci-après.

1.2. Vecteur minimal pXL2675

Après avoir rendu l'extrémité BsaI franche par action du fragment de Klenow, 15 le fragment BsaI-PvuII de 1,15 kb du plasmide pBKS+ (Stratagen) a été cloné avec le fragment SmaI de 1,2 kb du plasmide pUC4KIXX (Pharmacia) pour générer le plasmide pXL2647.

L'oligonucléotide 5542 :

20 5'-AGCTTCTCGA GCTGCAGGAT ATCGAATTCTG GATCCTCTAG AGC
GGCCGCG AGCTCC-3' (SEQ ID N°10)

et l'oligonucléotide 5543 :

5'-AGCTGGAGCT CGCGGCCGCT CTAGAGGATC CGAATTCGAT ATC
CTGCAGC TCGAGA-3' (SEQ ID N°11)

ont été hybridés entre eux puis clonés au site HindIII du pXL2647 générant le 25 plasmide pXL2675. Ce plasmide comprend le multisite HindIII, XbaI, PstI, EcoRV, EcoRI, BamHI, XbaI, NotI, SstI entre l'origine de réplication et le gène codant pour la résistance à la kanamycine.

1.3. Cassette luciférase dans le plasmide pXL2622

Le promoteur CMV contenu dans le fragment MluI-HindIII de 660 bp du plasmide pcDNA3 (provenant d'Invitrogen) a été cloné entre les sites MluI-HindIII du plasmide pGL2 basic (Promega contient le gène de la luciférase) pour générer le 5 plasmide pXL2622.

1.4. Plasmides pXL2563 et pMTL22-TH contenant une séquence susceptible de former une triple hélice avec un oligonucléotide.

L'oligonucléotide 4817 :

5'-GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA A
10 GAAGAAGAA GAAGAAGG-3'(SEQ ID N°12)

et l'oligonucléotide 4818 :

5'-AATTCCCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCT
TCTT CTTCTTCG-3'(SEQ ID N°13)

ont été hybridés entre eux et clonés aux sites EcoRI et BamHI du plasmide 15 pBluescriptII KS pour former le plasmide pXL2563. Le fragment EcoRI-BamHI de 62 bp est cloné aux sites EcoRI-BamHI du plasmide pMTL22 (P. Minton 1988 Gene 68:139) pour générer le plasmide pMTL22-TH.

1.5. Plasmides pXL565 et pXL2781 contenant le locus cer

Le fragment HpaII de 382 bp du plasmide ColE1 (P-L Biochemicals) a été 20 cloné au site AccI du plasmide M13 mp7 (Messing et coll. 1981 Nucleic Acids Res 9:309) pour former le plasmide pXL565. Le fragment BamHI de 382 bp du pXL565 a alors été cloné au site BglII du plasmide pSL301 (Invitrogen) pour créer le plasmide pXL2781.

1.6. Construction du plasmide pXL2784

Le fragment BamHI-XbaI du plasmide pXL2781 de 382 bp et contenant le locus cer est cloné aux sites BamHI et XbaI du plasmide pXL2675 pour créer le plasmide pXL2782.

Le fragment BglII-BamHI du plasmide pMTL22-TH de 62 bp contenant la séquence (GAA)₁₇ est cloné au site BamHI du plasmide pXL2782 pour former le plasmide pXL2783.

Enfin le fragment SacI-SpeI de 3,3 kb du plasmide pXL2622 et contenant la cassette de la luciférase est cloné aux sites XbaI et NheI du plasmide pXL2783 pour créer le plasmide pXL2784. Il est bien entendu que toute autre cassette d'expression d'un gène peut être insérée à la place de la cassette luciférase

La souche DH1 (Maniatis et al., 1989) contenant ce plasmide est cultivée en fermenteur de 2, 7 et jusqu'à 800 litres. D'autres souches peuvent également être utilisées.

2. Fermentation

L'hôte contenant l'ADN plasmidique à cultiver peut être obtenu par des techniques classiques de fermentation (Jung et al. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1988, 139, p129-146 ; Bauer et al. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, 18, p81-94) la technique du fed batch étant préférée. Après fermentation, les cellules sont récupérées, à l'échelle laboratoire, c'est à dire pour des volumes inférieurs à 5l, par centrifugation classique (20 mn à 10000 rpm) ou par centrifugation en continu pour des volume plus importants (volumes industriels pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de litres). Les cellules ainsi récupérées peuvent être utilisées tout de suite ou congelées à - 80°C.

3. Lyse chimique (lysat clair)

Les cellules sont, le cas échéant, décongelées puis lysées. La lyse chimique se décompose en trois étapes. La première consiste à remettre en suspension les cellules dans un tampon Tris 25mM pH 6,8, glucose 50mM, ETDA 10mM ou équivalent. La lyse des cellules est alors effectuée dans un mélange contenant NaOH 0,2M et SDS

1%. Le pH de la solution est d'environ 12. Le choix d'un détergent ionique s'impose, en effet un détergent non ionique donne des rendements d'extraction 10 fois plus faibles. La lyse est suivie d'une pseudo-neutralisation du milieu en présence d'acétate de potassium (le pH final de la solution est compris entre 5.5 et 6). Cette acidification
5 du milieu conduit à l'apparition d'un précipité contenant les protéines, une partie de l'ADN chromosomique et de l'ARN. Cette précipitation est due à la réaction du sodium dodecyl sulfate (SDS) avec l'acétate de potassium qui forment un précipité blanc de potassium dodecyl sulfate

Le précipité doit être éliminé. Pour ce faire on procède par centrifugation en
10 pots (15 min, 8000 rpm) si les volumes sont inférieurs à 5 litres ou par centrifugation en continu si les volumes sont plus élevés (> 5 litres). Une autre méthode pour éliminer le surnageant consiste à effectuer une filtration sur filtre en profondeur de porosité supérieure ou égale à 20 μm (PALL, profile II utilisé selon les spécifications du fabricant).

15 **4. Diafiltration**

Le surnageant récupéré après la lyse chimique est soumis à une diafiltration afin de concentrer l'ADN plasmidique et d'éliminer les molécules de petites masse moléculaire, en particulier les sels qui sont présents à fortes concentrations. Cette diafiltration se fait sur membrane de point de coupure compris entre 50 et 300 kD suivant la taille des plasmides. De préférence on utilise une membrane de point de coupure 100kD. La valeur de 100kD est une valeur nominale donnée pour des protéines qui sont des molécules globulaires. On considère que pour les molécules d'acides nucléiques, qui ont une structure spatiale différente, toutes les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 30kd sont éliminées. On mesure par HPLC la quantité
20 d'ADN présent dans la solution après diafiltration et la quantité présente dans le lysat clair. Le rapport ainsi déterminé donne le rendement de cette étape qui est supérieur
25 ou égal à 80%.

Au cours de cette diafiltration, les sels sont éliminés. Ils sont remplacés par un tampon phosphate 10mM. Il est ainsi possible d'appliquer le produit directement sur une colonne de chromatographie, en particulier de Ceramic Hydroxyapatite™

L'ADN plasmidique issu de la chromatographie d'affinité triple hélice est de 5 nouveau diafiltré afin de concentrer l'échantillon et d'éliminer les sels indésirables. Ceci permet d'équilibrer le produit dans le tampon de formulation approprié. Pour cela, une diafiltration sur membrane de point de coupure compris entre 10 et 50kD est effectuée. Le rendement est supérieur à 80%.

Le produit est ensuite filtré stérilement et soumis à analyses avant formulation.

10 5. Chromatographie sur colonne de Ceramic hydroxyapatite™

Le gel de Ceramic Hydroxyapatite™ est coulé dans une colonne de taille appropriée suivant le volume de l'échantillon à purifier et selon la pureté de l'échantillon de départ. Pour déterminer la taille de la colonne et le volume du gel on mesure par HPLC la quantité en mg/ml d'ADN présent dans la solution de départ. On 15 estime en effet que au moins 0.1mg d'ADN sont fixés par ml d'Hydroxyapatite cette valeur pouvant varier jusqu'à 1 mg voir plus en fonction de la quantité d'ARN présent dans la solution de départ. L'ARN se fixe sur le gel et plus la quantité d'ARN est importante moins l'ADN pourra se fixer. L'ARN est éliminé par élution différentielle. La colonne est équilibrée en tampon phosphate de faible force ionique (10 mM). 20 L'échantillon est déposé sur le gel à un débit linéaire de 50 cm/h. Le gel est ensuite soumis à un lavage par un tampon phosphate de conductivité plus élevée (150 mM). La majeure partie de l'ARN contenu dans l'échantillon est éliminée à ce stade. L'ADN plasmidique est éluté en augmentant à nouveau la conductivité du tampon phosphate (250mM). Les derniers contaminants sont éliminés par application de NaOH 0.5N qui 25 est neutralisée par du tampon phosphate à forte molarité (500mM) avant réutilisation éventuelle de la colonne. Dans le cas d'une production pharmaceutique, ce support a l'avantage de pouvoir subir une décontamination chimique en place puisqu'il résiste à la soude 0.5M, agent de nettoyage classique en chromatographie, mais aussi à des fortes concentrations d'éthanol.

La résolution de l'hydroxyapatite céramique est excellente. Cette étape du procédé permet d'éliminer plus de 80% des ARN, 99.9% d'ADN chromosomique et de diminuer d'un facteur 1000 la teneur en endotoxines. De plus cette technologie évite l'emploi de toutes enzymes d'origine bovine ou autre (pas de Rnase, ni de protéinase K), en outre sa résistance aux agents chimiques nous a permis de l'utiliser à ce jour plus de 40 fois sans problème de reproductibilité. Le rendement de chromatographie est supérieur ou égal à 80%.

6. Chromatographie d'affinité avec formation d'une triple hélice.

6.1. Préparation de la colonne

10 Matériel : La colonne utilisée est une colonne HiTrap activée au NHS (N-hydroxysuccinimide, Pharmacia) de 5 ml, connectée sur une pompe péristaltique (débit < 1ml/min). L'oligonucléotide spécifique utilisé possède un groupement NH₂ en 5'.

15 Les tampons utilisés dans cet exemple sont les suivants :

- Tampon de couplage : NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.
- Tampon A : éthanolamine 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.
- Tampon B : acétate 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4.

20 Méthode : La colonne est lavée par 30 ml de HCl 1 mM, puis l'oligonucléotide dilué dans le tampon de couplage (250 nmoles dans 5 ml) est appliqué sur la colonne et laissé 30 minutes à température ambiante. La colonne est lavée 3 fois successives par 30 ml de tampon A puis 30 ml de tampon B. L'oligonucléotide est ainsi lié covalemment à la colonne par une liaison CONH. La colonne est stockée à 4°C et peut être utilisée au moins quatre fois.

6.2. Purification de plasmide

25 Matériel :

Le plasmide pXL2784 (décrit en 1) a été purifié sur la colonne HiTrap couplée à l'oligonucléotide décrite en 7.1. Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :

Tampon F : NaCl 2M, acétate 0,2 M, pH 4,5.

5 Tampon E :Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

Méthode :

La colonne est lavée avec du tampon F, puis la solution contenant le plasmide est appliquée sur la colonne et incubé a moins deux heures à température ambiante. La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon E.

10 7. Chromatographie échangeuse d'ions.

L'échantillon pré-purifié est ensuite soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions faibles. En effet les anions forts ont la propriété de fixer très fortement l'ADN, si fortement qu'il est très difficile de récupérer le produit (le rendement est alors inférieur à 60%). C'est pourquoi la demanderesse utilise des échangeurs d'anions faibles qui ne retiennent pas l'ADN plasmidique mais qui fixent les ARN résiduels. On utilisera donc de préférence un échangeur d'anions faibles de type DEAE Sepharose ou DEAE hyper D ou équivalents. Le gel est équilibré en tampon phosphate 10mM, l'échantillon provenant de l'étape de chromatographie sur Ceramic Hydroxyapatite est directement appliqués sur le gel. L'ARN fixé est ensuite éliminé en appliquant une solution concentrée de NaCl. La décontamination chimique peut être faite avec une solution de soude 0.5 M ce qui permet de travailler dans de bonnes conditions d'hygiène (élimination des endotoxines et des risques de contamination microbienne.)

20 8. Dosage de l'ADN plasmidique dans des échantillons complexes par
25 HPLC

L'objectif de cette méthode est de pouvoir quantifier l'ADN plasmidique au cours des différentes étapes de purification afin de déterminer des rendements. On peut ainsi juger quantitativement et qualitativement de l'efficacité des différentes opérations

La technique utilisée est la suivante:

5 Le support chromatographique est un gel Poros R2 de chez Perseptive Biosystems. Il s'agit d'un support de polystyrènedivinylbenzène, la taille des particules est de 10 µm. La taille des pores de perfusion est de 6000 à 8000 Angströms, la taille des pores de diffusion étant de 500 à 1000. Le volume du gel est de 1,7ml.

Il s'agit d'une chromatographie paire d'ions. Le système de solvants est eau, 10 triéthylamine acétate pH 7,1 / triéthylamine acétate acetonitrile 90%.

Le débit est de 3 ml/min. Nous avons défini le gradient de façon à distinguer l'ADN plasmidique des ARN.

15 L'échantillon de référence est un ADN plasmidique purifié sur Qiagen selon les instructions du fabricant. Sur un gel d'agarose, cet échantillon ne contient que de l'ocDNA et du cccDNA. En HPLC, il ne donne qu'un seul pic. Sa concentration a été déterminée en mesurant sa DO à 260 nm et en prenant pour base 1 unité DO = 50 µg/ml d'ADN.

Nous avons donc injecté des quantités croissantes de ce produit afin d'effectuer une gamme d'étalonnage.

20 La surface des pics correspondant au temps de rétention de l'ADN de référence sont comparés à la gamme. Une quantification peut donc être effectuée.

9. Dosage de l'ADN chromosomique résiduel

25 L'ADN génomique résiduel est quantifié par PCR en utilisant des amorces dans le gène galK d'E. coli. La séquence des amorces du gène galK d'E. coli est (Debouck et al., Nucleic Acids Res., 1985, 13, 1841-1853) :

5'-CCG AAT TCT GGG GAC CAA AGC AGT TTC-3' (SEQ ID N°14)

et 5'-CCA AGC TTC ACT GTT CAC GAC GGG TGT-3' (SEQ ID N°15).

Le milieu réactionnel comprend, dans du tampon PCR (Promega France, Charbonnières) : 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM dXTP (Pharmacia, Orsay) ; 0,5 μM en amorce ; 20 U/ml Taq polymérase (Promega). La réaction est effectuée suivant la
5 séquence : - 5 min. à 95°C

- 30 cycles de 10 sec. à 95°C

30 sec. à 60°C

1 min. à 78°C

- 10 min. à 78°C.

10 Le fragment d'ADN amplifié, d'une longueur de 124 paires de bases, est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% en présence de SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene , USA), puis quantifié par référence à une gamme d'ADN génomique Ultrapur d'*E. coli*, souche B (Sigma, réf. D4889).

10. Transfection in vitro de cellules de mammifères

15 Cette méthode est employée pour doser l'activité biologique du plasmide purifié par le procédé selon l'invention. Les cellules utilisées sont des NIH 3T3, ensemencées la veille de l'expérience dans des plaques de culture à 24 trous, à raison de 50.000 cellules/trou. Le plasmide est dilué dans du NaCl 150 mM et mélangé avec un lipofectant. On utilise un rapport charges positives du lipofectant/charges négatives
20 de l'ADN égal à 3. Le mélange est vortexé, laissé 10 minutes à température ambiante, dilué dans du milieu de culture dépourvu de sérum de veau foetal, puis ajouté aux cellules, à raison de 1 μg d'ADN par trou de culture. Après deux heures à 37°C, on ajoute 10% v/v de sérum de veau foetal et les cellules sont incubées 48 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules sont lavées deux fois au PBS et l'activité luciférase est mesurée selon le protocole décrit (kit Promega, Promega Corp. Madison, WI), sur un luminomètre Lumat LB9501 (EG et G Berthold, Evry). Les protéines sont dosées avec la technique BCA (Pierce, Interchim, Asnières).

11. Techniques diverses :

Le plasmide obtenu, analysé par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium, se présente sous la forme d'une seule bande d'ADN circulaire "super enroulé". Aucune trace d'ADN de haut poids moléculaire (chromosomique), ni 5 d'ARN n'est détectable dans le plasmide purifié.

La concentration en protéines dans les échantillons est mesuré par Micro-BCA (Pierce) selon les instructions du fabricant.

La concentration en endotoxines est estimée par le dosage LAL (Biosepra) selon les instructions du fabricant.

10 Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que les digestions par des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, la transformation dans *E. coli*, la précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis et al., T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory. 15 Press, New York ; Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kinston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Wiley and Sons, New York.). Les séquences nucléotidiques ont été déterminées par la méthode de terminaison de chaînes en suivant le protocole déjà présenté (Ausubel et al., 1987).

20 Les enzymes de restriction ont été fournies par New-England Biolabs, Beverly, MA (Biolabs).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont incubés dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence d'ADN ligase du phage T4 (Biolabs.).

25 Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en β par un groupement cyanoéthyl (Sinha, N. D., J. Biernat, J. McManus and H. Köster. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis,

XVIII: Use of β -cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. Nucl. Acids Res., 12, 4539-4557 ; Giles, J. W. 1985. Advances in automated DNA synthesis. Am. Biotechnol., Nov./Dec.) avec le 5 synthétiseur automatique d'ADN Biosearch 8600 en utilisant les recommandations du fabricant.

Les ADN ligaturés ou à tester pour leur efficacité de transformation sont utilisés pour transformer la souche rendue compétente: *E. coli* DH5 α [F' / *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, D(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, 10 *F80dlac(lacZDM15)*]

Les minipréparations d'ADN plasmidique sont faites suivant le protocole de Klein et al., 1980.

Le milieu de culture LB est utilisé pour la croissance des souches d'*E. coli* (Maniatis et al., 1982). Les souches sont incubées à 37°C. Les bactéries sont étalées 15 sur des boites de milieu LB supplémenté avec des antibiotiques appropriés.

EXEMPLES

Exemple 1. Purification d'un ADN plasmidique sur colonne hydroxyapatite céramique

1.1. Préparation du lysat clair

Matériel:

Les solutions utilisées dans cet exemple sont les suivantes :

Tris 25mM pH 6,8, glucose 50mM, ETDA 10mM : solution 1

NaOH 0,2M et SDS 1% : solution 2

Acétate de potassium 3M, pH 5: solution 3

Méthode:

200 g de cellules sont mises en suspension dans 2200 ml de solution 1. La solution 2 (2200 ml également) est ensuite additionnée. Enfin, 1100 ml de solution 3

sont rajoutés. Le précipité alors formé est éliminé par centrifugation à 9000 rpm pendant 30 min. On obtient 5200 ml de surnageant.

1.2. Diafiltration

Matériel :

5 Membrane Maximate (Filtron) de point de coupure 100 kD de surface 1860 cm²
Tampon : Phosphate de sodium 100 mM pH 6,8

Méthode :

Avant utilisation, la membrane subit une décontamination chimique à la soude
10 0,5M pendant 1H. La soude est ensuite éliminée par de l'eau ppi.

Le surnageant obtenu lors de l'étape 1.1 est concentré environ 10 fois puis diafiltré contre 4 volumes d'eau puis contre 4 volumes de tampon phosphate 100mM et pH 6,8. Le volume final est de 810 ml. L'échantillon contient alors 224 mg d'ADN plasmidique déterminé par HPLC.

15 1.3. Purification sur Ceramic Hydroxyapatite™

Matériel :

Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :

Tampon A = tampon 10 mM phosphate pH 6,8
Tampon B = tampon 150 mM phosphate pH 6,8 ,
20 Tampon C = tampon 250 mM phosphate pH 6,8
Tampon D = tampon 500 mM phosphate pH 6,8
NaOH 0,5M

Méthode :

La colonne (de diamètre 113 mm et de hauteur 17 cm) contient 1700 ml de gel.

25 Avant utilisation, le gel subit une décontamination chimique par de la soude 0,5M pendant 1 heure. La soude est ensuite éliminée par application de tampon D. Puis, la colonne est équilibrée en tampon A.

On applique sur le gel 610 ml provenant des 810 ml (soit 171 mg) obtenus précédemment. Le débit est de 60 ml/min. Le gel est ensuite lavé par 6 L de tampon B. Le produit est ensuite élué en appliquant du tampon C. Le volume d'eluat est de 1520 ml et contient 147 mg d'ADN plasmidique (déterminé par HPLC).

- 5 Le gel est ensuite régénéré par lavage avec de la soude (NaOH 0,5M) suivi par du tampon D. Le gel est alors prêt pour un nouveau cycle.

L'ensemble des opérations est suivi par spectrométrie UV à 254 nm.

1.4. Purification sur DEAE Sepharose

Matériel :

- 10 Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :
Tampon A , NaCl 1M et NaOH 0,5M.

Méthode :

La colonne (de diamètre 50 mm et de hauteur 6 cm) contient 110 ml de gel.

- Avant utilisation, le gel subit une décontamination chimique par de la soude 15 0,5M pendant 1 heure. La soude est ensuite éliminée par une solution de NaCl 1M . Puis, la colonne est équilibrée en tampon A.

- 1130 ml issues des 1520 ml (soit 110 mg) obtenus précédemment sont appliqués sur le gel à un débit de 50 ml/min. L'ADN n'étant pas retenu, l'effluent est recueilli (1036 ml) et contient 104 mg d'ADN. Les produits retenus sur le gel sont ensuite éliminés par une solution de NaCl 1M. Le gel est alors lavé par de la soude 20 0,5M suivi de NaCl 1M. Le gel est alors prêt pour une nouvelle opération.

L'ensemble des opérations est suivi spectrométrie UV à 254 nm.

1-5 Diafiltration

Matériel :

- 25 Membrane Ultrasette (Filtron) de point de coupure 30 kD de surface 860 cm²
Tampon : eau ppi

Méthode :

Avant utilisation, la membrane subit une décontamination chimique à la soude 0,5M pendant 1H. La soude est ensuite éliminée par de l'eau ppi. 720 ml du produit obtenu lors de l'étape précédente sont concentrés environ 3 fois puis diafiltrer deux 5 fois contre 4 volumes d'eau ppi. Le volume final est de 210 ml. L'échantillon contient alors 62 mg d'ADN plasmidique déterminé par HPLC.

1.6 Caractéristiques de l'ADN.

Le procédé décrit ci-dessus permet d'obtenir le plasmide quasiment pur. Les différentes composants de l'échantillon final ont été déterminés et sont récapitulés 10 ci-après.

- ARN : non détectable en gel d'agarose ou en HPLC
- ADN chromosomique déterminé par PCR: <0.5 %
- ADN super-enroulé déterminé par HPLC >80 %
- endotoxines (LAL) < 50 EU/mg
- 15 - protéines (microBCA) < 1 μ g/ml
- activité biologique in vitro :

pXL2784 lot 42DNA95 : 20×10^6 RLU/ μ g protéines (à comparer avec le même plasmide purifié sur gradient de Chlorure de Césium = 13×10^6 RLU/ μ g protéines).

20 1.7 Variante.

Le procédé décrit ci-dessus a été reproduit en effectuant dans l'étape 1.1, une filtration sur membrane de profondeur à la place de la centrifugation. Cette variante du procédé permet d'obtenir un plasmide de pureté pharmaceutique, dont les caractéristiques sont récapitulées ci-après.

- ARN : non détectable en gel d'agarose ou par HPLC
- ADN chromosomique déterminé par PCR : < 0.5 %
- ADN superenroulé déterminé par HPLC >70 %
- endotoxines (LAL) < 50 EU/mg
- 5 - protéines (micro BCA) < 1 µg/ml

Exemple 2 Purification de l'éluat d'hydroxyapatite par chromatographie d'affinité triple hélice

2.1. Préparation de la colonne d'affinité

La colonne utilisée est une colonne HiTrap activée au NHS (N-hydroxysuccinimide, Pharmacia) de 5 ml, connectée sur une pompe péristaltique.
10 L'oligonucléotide spécifique utilisé possède un groupement NH₂ en 5'. Sa séquence est la suivante :

5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID N°1).

Les tampons utilisés dans cet exemple sont les suivants :

15 Tampon de couplage : NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.

Tampon A : éthanolamine 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.

Tampon B : acétate 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4.

La colonne est lavée par 30 ml de HCl 1 mM, puis l'oligonucléotide dilué dans le tampon de couplage (250 nmoles dans 5 ml) est appliqué sur la colonne et laissé 30 minutes à température ambiante. La colonne est lavée 3 fois successives par 30 ml de tampon A puis 30 ml de tampon B. L'oligonucléotide est ainsi lié covalemment à la colonne par une liaison CONH. La colonne est stockée à 4°C.
20

2.2. Purification du plasmide

Les tampons utilisés sont les suivants :

Tampon F : NaCl 2M, acétate 0,2 M, pH 4,5.

Tampon E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

La colonne est équilibrée dans le tampon F, puis 9ml d'éluat d'hydroxyapatite obtenu dans les conditions décrites dans l'exemple 1.3., préalablement ajustés à 2M NaCl et pH 4,5, sont appliqués en boucle sur la colonne pendant une nuit à température ambiante (débit 0,5 ml/min). La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon E. L'ADN est détecté par spectrométrie U.V. à 254 nm.

2.3. Caractéristiques de l'ADN purifié

L'ADN purifié analysé par HPLC (méthode décrite ci-dessus) se présente sous forme d'un seul pic à un temps de rétention de 24,8 min. Aucune trace d'ARN n'est détectable. De même, après électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloration au bromure d'éthidium, l'ADN purifié ne présente aucune trace détectable d'ARN.

L'ADN a également été analysé par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Gen-Pak Fax Waters, qui sépare l'ADN relâché de l'ADN surenroulé. L'échantillon purifié contient 97% d'ADN surenroulé contre 80% d'ADN surenroulé dans l'échantillon déposé.

L'ADN génomique d'*E. coli* a été quantifié par PCR selon la technique décrite au paragraphe 3 : l'ADN purifié sur colonne d'affinité contient environ 0,01% d'ADN génomique.

Exemple n°3

3.1. Purification du plasmide.

On utilise une colonne d'affinité préparée comme décrit à l'exemple 2 avec l'oligonucléotide de séquence :

25 5'-CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT-3' (SEQ ID N°2).

Les tampons utilisés sont :

Tampon F : NaCl 2M, acétate de sodium 0,2 M, pH 4,5.

Tampon E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

La colonne est équilibrée dans le tampon F, puis on dépose 0.8mg de plasmide
5 purifié selon le protocole de l'exemple 1.7, dilué dans 10 ml de tampon F. L'échantillon
est recirculé en boucle sur la colonne pendant une nuit à température ambiante (débit
0,5 ml/min). La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon
E. L'ADN est détecté par spectrométrie U.V. à 254 nm.

3.2. Caractéristiques de l'ADN purifié

10 L'ADN obtenu a été analysé par chromatographie échangeuse d'anions sur
colonne Gen-Pak Fax Waters, qui sépare l'ADN relâché de l'ADN surenroulé.
L'échantillon purifié contient 100% d'ADN surenroulé, contre 72% dans l'échantillon
déposé sur la colonne d'affinité.

15 L'ADN génomique d'*E. coli* a été quantifié par PCR selon la technique décrite
plus haut : l'ADN purifié sur colonne d'affinité contient environ 0,01% d'ADN
génomique, contre environ 0,3% dans l'échantillon déposé sur la colonne d'affinité.

Exemple 4 : Changement d'échelle de la chromatographie d'affinité triple hélice après purification de l'eluat d'hydroxyapatite (pXL 2784)

4.1. Préparation de la colonne d'affinité

20 La colonne utilisée est une colonne contenant du Sépharose 4 Fast Flow activé
au NHS (N-hydroxysuccinimide, Pharmacia) et couplé à un oligonucléotide de
séquence :

5'-CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT-3' [(CTT)₇ : SEQ ID n° 2]

selon la méthode décrite dans l'exemple 2.1.

La colonne (diamètre 26 mm, hauteur : 16cm) contient 80 ml de gel et est connectée sur une pompe péristaltique.

4.2. Purification du plasmide

Les tampons utilisés sont les suivants :

5 Tampon F : NaCl 2M, acétate de sodium 0.2 M, pH 4.5.

Tampon E :Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

La colonne est équilibrée dans le tampon F, puis 135 ml soit 8 mg d'éluat d'hydroxyapatite obtenu dans les conditions décrites dans l'exemple 1.3., préalablement ajustés à 2M NaCl et pH 4,5, sont appliqués sur la colonne (débit 1,25 ml/min) en recirculant quatre fois. La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon E. L'ADN est détecté par spectrométrie U.V. à 254 nm : 2,2 mg sont récupérés.

4.3. Caractéristiques de l'ADN purifié

L'ADN purifié analysé par HPLC (méthode décrite ci-dessus) se présente sous forme d'un seul pic à un temps de rétention de 24,4 min. Aucune trace d'ARN n'est détectable. De même, après électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloration au bromure d'éthidium, l'ADN purifié ne présente aucune trace détectable d'ARN.

L'ADN a également été analysé par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Gen-Pak Fax Waters, qui sépare l'ADN relâché de l'ADN surenroulé. 20 L'échantillon purifié contient 100% d'ADN surenroulé contre 94% d'ADN surenroulé dans l'échantillon déposé.

L'ADN génomique d'*E. coli* a été quantifié par PCR selon la technique décrite au paragraphe 3 : l'ADN purifié sur colonne d'affinité contient environ 0,02% d'ADN génomique contre 2% dans l'échantillon déposé.

25 Exemple 5 : Purification à grande échelle d'un ADN plasmidique sur colonne hydroxyapatite céramique

5.1. Préparation du lysat clair

Le lysat clair est préparé comme décrit dans l'exemple 1.1 à partir d'une culture de bactéries E.coli transformées par le plasmide pXL2774. Le plasmide pXL2774 a une taille réduite (environ 4,5 kb) et comprend notamment :

- 5 - une cassette d'expression du gène Luc (promoteur CMV-luc-poly(A)+)
 - le marqueur de sélection sup Phe
 - l'origine de réplication ori γ de R6K
 - le fragment cer de ColE1

10 Méthode:

456 g de cellules sont mises en suspension dans 5000 ml de solution 1. La solution 2 (5500 ml) est ensuite additionnée. Enfin, 2500 ml de solution 3 sont rajoutés. Le précipité alors formé est éliminé par centrifugation à 9000 rpm pendant 30 min ou par filtration. On obtient 12,3 L de surnageant.

15 5.2. Diafiltration

Matériel:

Membrane Maximate (Filtron) de point de coupure 100 kD de surface 1860 cm²

Tampon : Phosphate de sodium 100 mM pH 6,8

20 Méthode:

L'échantillon est diafiltré selon la méthode décrite dans l'exemple 1.2

Le volume final est de 945 ml. L'échantillon contient alors 253 mg d'ADN plasmidique déterminé par HPLC.

5.3. Purification sur Ceramic Hydroxyapatite™

25 Matériel:

Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :

Tampon A = tampon 100 mM phosphate pH 6.8

Tampon B = tampon 150 mM phosphate pH 6.8 ,

Tampon C = tampon 250 mM phosphate pH 6;8

Tampon D = tampon 500 mM phosphate pH 6,8

NaOH 0,5M

5 *Méthode :*

La colonne (de diamètre 100 mm et de hauteur 23 cm) contient 1700 ml de gel.

Avant utilisation, le gel subit une décontamination chimique par de la soude

0,5M pendant 1 heure. La soude est ensuite éliminée par application de tampon D.

Puis, la colonne est équilibrée en tampon A.

10 On applique sur le gel 475 ml provenant des 945 ml (soit 128 mg) obtenus précédemment. Le débit est de 65 ml/min. Le gel est ensuite lavé par 6 L de tampon B. Le produit est ensuite éluté en appliquant du tampon C. Le volume d'éluat est de 1760 ml et contient 100 mg d'ADN plasmidique (déterminé par HPLC).

15 Le gel est ensuite régénéré par lavage avec de la soude (NaOH 0,5M) suivi par du tampon D. Le gel est alors prêt pour un nouveau cycle.

L'ensemble des opérations est suivi par spectrométrie UV à 254 nm..

5.4 Diafiltration

La diafiltration a été réalisée selon le protocole décrit dans l'exemple 1.5.

5.5 Caractéristiques de l'ADN.

20 Le procédé décrit ci-dessus permet d'obtenir le plasmide quasiment pur. Les différentes composants de l'échantillon final ont été déterminés et sont récapitulés ci-après.

- ARN : non détectable en gel d'agarose

- ADN chromosomique déterminé par PCR: 0.6 %

- ADN super-enroulé déterminé par HPLC : 87 %

- endotoxines (LAL) < 50 EU/mg

- protéines (microBCA) < 1 μ g/ml

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, AVENUE RAYMOND ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165
- (G) TELEPHONE: (1) 40.91.70.36
- (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.91

10

15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE DE
QUALITE PHARMACEUTIQUE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 15

20

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAGGCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTT

25

45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

50

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT

21

60

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15 AAGGGAGGGAA GGAGAGGAA
19

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

30 AAGGGAGAGGA GGGAGGGAA

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

45 TTGGTGTGGT GGGTGGGTT
45

45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

55 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

60 CTTCCCGAAG GGAGAAAGG

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7

15 GAAGGGTTCT TCCCTCTTTC C

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 13 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8

30 GAAAAAAGGAA GAG

13

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9

50 AAAAAAAGGGA ATAAGGG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- 55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 56 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

60 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10

AGCTTCTCGA GCTGCAGGAT ATCGAATTG GATCCTCTAG AGCGGCCGCG AGCTCC 56

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- 10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 56 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11

20 AGCTGGAGCT CGCGGCCGCT CTAGAGGATC CGAATTGATC ATCCTGCAGC TCGAGA 56

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 58 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12

35 GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGG 58

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 58 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13

50 AATTCCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCG 58

55 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- 60 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple

41

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14

CCGAATTCTG GGGACCAAAG CAGTTTC

27

10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15

CCAAGCTTCA CTGTTCACGA CGGGTGT

27

25

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification d'ADN double brin de pureté pharmaceutique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique.
- 5 2. Procédé de purification d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend deux étapes de chromatographie dont une sur colonne d'hydroxyapatite.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité ou d'échange d'ions.
- 10 4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une séquence de l'ADN et un oligonucléotide immobilisé, avec formation d'une triple hélice.
5. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'échange d'anions.
- 15 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de diafiltration.
7. Procédé de purification d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - lyse chimique des cellules,
 - diafiltration,
 - chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique,
 - chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une
- 20 25 séquence de l'ADN et un oligonucléotide immobilisé, avec formation d'une triple hélice.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'ADN double brin comprend en outre une ou plusieurs séquences d'intérêt.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'ADN double brin est un ADN plasmidique.

5 10. Préparation d'ADN plasmidique recombinant caractérisée par une teneur en ADN chromosomique inférieure ou égale à 0,01 %.

11. Préparation d'ADN plasmidique recombinant purifié selon la revendication 10 caractérisée par une teneur en endotoxine inférieure ou égale à 50 EU/ mg.

12. Préparation d'ADN plasmidique recombinant purifié selon la revendication 10 11 caractérisée par une teneur en endotoxine inférieure ou égale à 10 EU/ mg;

13. Composition pharmaceutique comprenant un ADN obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

1 / 1

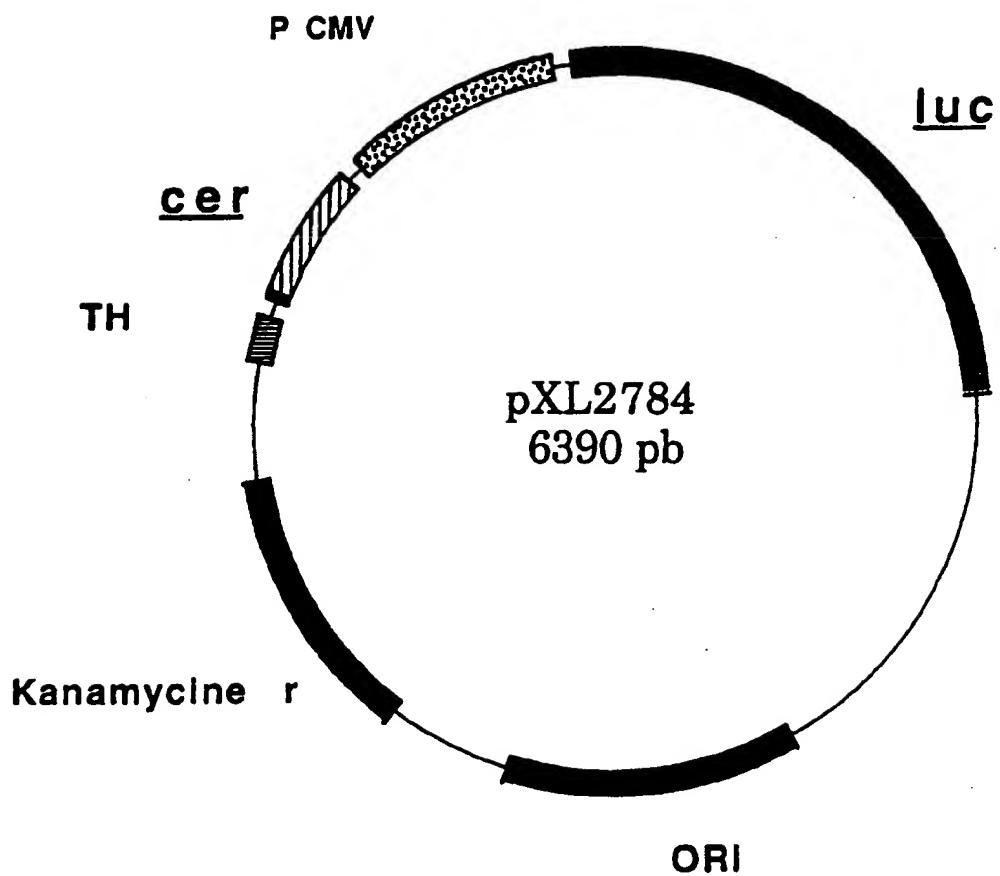


Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/FR 97/00472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/10 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N C07H C12Q C12P G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D.L. PYLE ED.: "Separations for Biotechnology Vol. 3" 15 September 1994, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE GB XP000196608 see page 138 - page 139 ---	1,2
X	DATABASE JAPAN SCIENCE & TECH CORP JICST ACCESSION NUMBER 89AG087153, XP002019237 & CERAMICS JAPAN, vol. 23, no. 11, 1988, JAPAN, pages 1065-1068, N. KOJI: "SEPARATION OF PROTEINS, NUCLEIC ACIDS AND GLYCOSIDES ON HYDROXYAPATITE" see abstract ---	1,2 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

6 June 1997

Date of mailing of the international search report

01.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00472

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 313 090 A (ASAHI KOGAKU KOGYO KABUSHISI KAISHA) 26 April 1989 see page 2, column 1, line 36 - line 46 ---	1-5,13
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH) 10 August 1995 *page 3, 2ème paragraph-page 9* see abstract ---	6-8, 10-12
A	EP 0 325 032 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 26 July 1989 see the whole document ---	7-9
A	WO 94 16075 A (GENETICS INSTITUTE INC.) 21 July 1994 see page 22, line 19 - page 23, line 11 ---	7-9
A	EP 0 375 408 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 27 June 1990 see the whole document ---	2-5,7-9
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 89, 1992, WASHINGTON DC,US, pages 495-498, XP002000128 T. ITO ET AL.: "Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture" *voir discussion* ---	3,4
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 618, 1993, AMSTERDAM,NL, pages 315-339, XP002000129 H.W. JARRET: "Affinity chromatography with nucleic acid polymers" see the whole document ---	3,4
A	BIOCHEMISTRY, vol. 28, 1989, COLUMBUS OH, US, pages 7859-7870, XP000609103 P. RAJAGOPAL AND J. FEIGON: "NMR studies of triple-strand formation from the homopurine-homopyrimidine deoxyribonucleotides d(GA)4 and d(TC)4" cited in the application see the whole document -----	3,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No.

PCT/FR 97/00472

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0313090 A	26-04-89	DE 3888079 D		07-04-94
		DE 3888079 T		14-07-94
		US 5030611 A		09-07-91
		JP 2064075 A		05-03-90

WO 9521177 A	10-08-95	DE 4432654 A		21-03-96
		AU 1577695 A		21-08-95
		AU 1577795 A		21-08-95
		AU 1664695 A		21-08-95
		CA 2182388 A		10-08-95
		CA 2182397 A		10-08-95
		CA 2182398 A		10-08-95
		WO 9521178 A		10-08-95
		WO 9521179 A		10-08-95
		EP 0743948 A		27-11-96
		EP 0775150 A		28-05-97
		EP 0743949 A		27-11-96
		AU 1664795 A		29-03-96
		WO 9608500 A		21-03-96

EP 0325032 A	26-07-89	JP 1135792 A		29-05-89

WO 9416075 A	21-07-94	AU 6125294 A		15-08-94
		JP 8505534 T		18-06-96

EP 0375408 A	27-06-90	AT 118818 T		15-03-95
		AU 640910 B		09-09-93
		AU 4838490 A		10-07-90
		CA 2006008 A		20-06-90
		DE 68921315 D		30-03-95
		DE 68921315 T		03-08-95
		EP 0449972 A		09-10-91
		ES 2069598 T		16-05-95
		JP 4502407 T		07-05-92
		PT 92640 B		12-09-95
		WO 9006934 A		28-06-90
		US 5176996 A		05-01-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No
PCT/FR 97/00472

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/10 C07H21/00 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07H C12Q C12P G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
X	D.L. PYLE ED.: "Separations for Biotechnology Vol. 3" 15 Septembre 1994 , ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY , CAMBRIDGE GB XP000196608 voir page 138 - page 139 ---	1,2
X	DATABASE JAPAN SCIENCE & TECH CORP JICST ACCESSION NUMBER 89A0087153, XP002019237 & CERAMICS JAPAN, vol. 23, no. 11, 1988, JAPAN, pages 1065-1068, N. KOJI: "SEPARATION OF PROTEINS, NUCLEIC ACIDS AND GLYCOSIDES ON HYDROXYAPATITE" voir abrégé ---	1,2 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *'L' document pouvant porter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'il indique)
- *'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Juin 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01.07.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No	PCT/FR 97/00472
---------------------------	-----------------

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 313 090 A (ASAHI KOGAKU KOGYO KABUSHIKA KAISHA) 26 Avril 1989 voir page 2, colonne 1, ligne 36 - ligne 46 ---	1-5, 13
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH) 10 Août 1995 *page 3, 2ème paragraph-page 9* voir abrégé ---	6-8, 10-12
A	EP 0 325 032 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 26 Juillet 1989 voir le document en entier ---	7-9
A	WO 94 16075 A (GENETICS INSTITUTE INC.) 21 Juillet 1994 voir page 22, ligne 19 - page 23, ligne 11 ---	7-9
A	EP 0 375 408 A (Baylor COLLEGE OF MEDICINE) 27 Juin 1990 voir le document en entier ---	2-5, 7-9
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 89, 1992, WASHINGTON DC, US, pages 495-498, XP002000128 T. ITO ET AL.: "Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture" *voir discussion* ---	3, 4
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 618, 1993, AMSTERDAM, NL, pages 315-339, XP002000129 H.W. JARRET: "Affinity chromatography with nucleic acid polymers" voir le document en entier ---	3, 4
A	BIOCHEMISTRY, vol. 28, 1989, COLUMBUS OH, US, pages 7859-7870, XP000609103 P. RAJAGOPAL AND J. FEIGON: "NMR studies of triple-strand formation from the homopurine-homopyrimidine deoxyribonucleotides d(GA)4 and d(TC)4" cité dans la demande voir le document en entier -----	3, 4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No
PCT/FR 97/00472

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0313090 A	26-04-89	DE 3888079 D DE 3888079 T US 5030611 A JP 2064075 A	07-04-94 14-07-94 09-07-91 05-03-90
WO 9521177 A	10-08-95	DE 4432654 A AU 1577695 A AU 1577795 A AU 1664695 A CA 2182388 A CA 2182397 A CA 2182398 A WO 9521178 A WO 9521179 A EP 0743948 A EP 0775150 A EP 0743949 A AU 1664795 A WO 9608500 A	21-03-96 21-08-95 21-08-95 21-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 27-11-96 28-05-97 27-11-96 29-03-96 21-03-96
EP 0325032 A	26-07-89	JP 1135792 A	29-05-89
WO 9416075 A	21-07-94	AU 6125294 A JP 8505534 T	15-08-94 18-06-96
EP 0375408 A	27-06-90	AT 118818 T AU 640910 B AU 4838490 A CA 2006008 A DE 68921315 D DE 68921315 T EP 0449972 A ES 2069598 T JP 4502407 T PT 92640 B WO 9006934 A US 5176996 A	15-03-95 09-09-93 10-07-90 20-06-90 30-03-95 03-08-95 09-10-91 16-05-95 07-05-92 12-09-95 28-06-90 05-01-93

THIS PAGE BLANK (USPTO)